



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①0 **DE 44 03 789 A 1**

②1 Aktenzeichen: P 44 03 789.9
②2 Anmeldetag: 3. 2. 94
④3 Offenlegungstag: 10. 8. 95

⑤1 Int. Cl.⁶:
A 61 K 49/00
A 61 K 51/00
A 61 K 49/04
A 61 K 9/50
A 61 K 9/58
C 07 F 13/00
// C 01 G 49/08, C 09 B
47/00, 61/00, C 09 K
11/06, C 09 B 11/28

DE 44 03 789 A 1

⑦1 Anmelder:
Schering AG, 13353 Berlin, DE

⑦2 Erfinder:
Heywang-Köbrunner, Sylvia, Dr., 04103 Leipzig, DE;
Weitschies, Werner, Dr., 10961 Berlin, DE; Speck,
Ulrich, Prof. Dr., 13465 Berlin, DE; Fritzsche, Thomas,
Dr., 12169 Berlin, DE

⑤4 Mittel zur visuellen Markierung von Körpergewebe

⑤7 Die Erfindung betrifft die Verwendung von farbigen NMR-,
Röntgen- oder gegebenenfalls Farbstoff-enthaltenden Ultra-
schall-bildgebenden Substanzen, zur Markierung von Kör-
pergewebe.

DE 44 03 789 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
BUNESDRUCKEREI 06. 95 508 032/311

6/35

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt die Verwendung von farbigen NMR- oder Röntgenkontrastmitteln oder von gegebenenfalls farbstoffhaltigen Ultraschallkontrastmitteln zur Herstellung eines diagnostischen Mittels zur visuellen Markierung von Körpergewebe.

Mit zunehmender Verfeinerung der radiologischen Bildgebung werden immer mehr kleine Veränderungen entdeckt, die für den Chirurgen zum Teil weder bei der klinischen Untersuchung noch intraoperativ sicher tastbar sind. So können Strukturen bis zu 1 mm³ sichtbar gemacht werden. Derartige Veränderungen können auch für den Pathologen schwer auffindbar sein, da aus Kosten- und Zeitgründen die sehr aufwendige millimeterweise Aufarbeitung größerer Gewebe im allgemeinen nicht möglich ist. Dies ist besonders wichtig beim Nachweis kleiner Malignome, bei Malignom-Frühstadien wie in-situ-Karzinomen (die fast regelmäßig nicht tastbar sind) und zum Nachweis der sicheren Excision bei radiologisch unklaren Veränderungen, wo sich eventuell histologisch kein Malignom findet. Als Beispiele für Veränderungen, die präoperativ markiert werden müssen, seien genannt: Nicht tastbare beim mammographischen Screening gefundene suspekt Veränderungen oder kleine subpleurale Veränderungen, die zum Metastasenausschluß oder -nachweis für die Therapieentscheidung bei Patienten mit Sarkomen oder Hodentumoren excidiert werden müssen.

Um das Auffinden solcher Veränderungen ohne unnötige Traumatisierung oder Entfernung großer gesunder umgebender Gewebe sicherzustellen und um eine zuverlässige Korrelation zum histopathologischen Befund (auch aus forensischen Gründen) zu gewährleisten, müssen solche Veränderungen präoperativ unter sogenannter Röntgen-, Ultraschall-, computertomographischer oder kernspintomographischer Steuerung markiert werden.

Für radiologisch gesteuerte Gewebemarkierungen wurden — nach Darstellung der Läsion mit dem entsprechenden radiologischen Verfahren — bisher vorwiegend folgende Techniken angewandt:

1. Markierung der über dem Gewebe liegenden Haut durch einen Gegenstand oder durch Farbe.
2. Eine Nadel oder Draht (im allgemeinen mit Verankerungsmöglichkeit) wird an den Herd geführt und dort bis zur Operation belassen.
3. Das zu excidierende Gewebe wird durch Einspritzen eines Farbstoffes direkt markiert.

Die genannten Techniken sind jedoch mit verschiedenen Nachteilen behaftet. So ist die Methode 1 ungenau bei Läsionen in tieferliegendem Gewebe, insbesondere bei Gewebe mit deutlicher Atemverschieblichkeit (z. B. Mammakarzinom). Methode 2 überwindet diesen Nachteil, dafür besteht allerdings erhöhte Infektionsgefahr, insbesondere dann, wenn ein längerer Zeitraum zwischen der Diagnose und der Operation liegt. Der Patientenkomfort ist gering, des weiteren besteht die Gefahr der Dislokation trotz Verankerung sowie die Gefahr des intraoperativen Abschneidens und somit Verbleibens eines spitzen Fremdkörpers im Gewebe [A.W.M.C. Owen and E. Nanda Kumar: Migration of localizing wires used in guided biopsy of the breast. Clin. Radiology (1991) 43, 251. J.B. Bristol, Jones, P.A.: Transgression of a localizing wire into the pleural cavity prior to mam-

mography. Br. J. Radiology (1981) 54, 139—140. L.S. Gormly, L.W. Bassett: Pre biopsy needle localizing, ductography and pneumocystography. In: Mitchell, G.W., Bassett, L.W.: (eds): The female breast and its disorders. Baltimore, Williams and Wilkins, 1990].

Derzeit häufigst angewendete Methode ist die Methode 3. Im allgemeinen wird dabei unter radiologischer Kontrolle eine Injektionsnadel direkt in den Herd eingeführt und der betreffende Farbstoff injiziert. Dabei ist jedoch — besonders bei kleinen Läsionen — nicht sichergestellt, daß der Farbstoff tatsächlich in die Läsion injiziert wurde. So geschieht es häufig, daß der Farbstoff dicht am Herd vorbei injiziert wird. Um den Aufenthaltsort des Farbstoffs exakt zu lokalisieren, mischt man diesen daher im allgemeinen mit einem Kontrastmittel (NMR, Röntgen), welches leicht in einem entsprechenden bildgebenden Verfahren detektierbar ist und aus dessen räumlicher Lage auch auf die genaue Lage des Farbstoffs geschlossen werden kann. Als Farbstoffe zur Gewebemarkierung kommen bisher einerseits wasserlösliche Farbstoffe, wie Indigocarmin oder Methylenblau etc. oder nichtlösliche Stoffe, wie aufgeschwemmte sterile Aktivkohle zur Anwendung.

Wasserlösliche Farbstoffe haben — abgesehen von wenigen allergischen Reaktionen — den Vorteil der annehmbaren Verträglichkeit. Sie sind für den Chirurgen gut sichtbar und werden vollständig ausgeschieden. Ihr Hauptnachteil ist, daß sie sehr rasch im Gewebe diffundieren. Bereits bei einem relativ kurzen Intervall (ab 1—2 Stunden) zwischen radiologischer Markierung und Operation breitet sich der Farbstoff rasch in die Umgebung aus, so daß große Areale angefärbt sind und eine exakte Zuordnung dann nicht mehr möglich ist.

Die sterile, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Aktivkohle hingegen bleibt großenteils am Injektionsort liegen, bis sie vom Operateur entfernt wird. Dies erleichtert die Zeitplanung zwischen radiologischer Markierung und z. B. einer Operation im Routinebetrieb erheblich. Außerdem ist bei guter Markierung im allgemeinen eine exakte histopathologische Korrelation ohne Schwierigkeiten möglich. Als Nachteile der Aktivkohle sind jedoch zu nennen, daß diese vom Körper nicht ausgeschieden werden kann und zu reaktiven Veränderungen im Gewebe oder in drainierenden Lymphknoten führen kann. Außerdem neigt auch feinstpartikuläre Aktivkohle — möglicherweise durch elektrostatische Effekte — zum Klumpen. Dies ist ein deutlicher Nachteil, da Nadeln bis zu 18 Gauge häufig verstopfen und damit eine erneute Markierung mit neuer Nadel erfolgen muß.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher ein Markierungsmittel bereitzustellen, daß die Nachteile des Standes der Technik überwindet, d. h. ein Markierungsmittel zu finden, das

1. gut verträglich ist,
2. eine Immobilität im Gewebe über einen ausreichend langen Zeitraum aufweist,
3. sowohl visuell als auch radiologisch in dem betreffenden Gewebe erkennbar ist und das
4. gut injizierbar durch lange und dünne Kanülen ist.

Die Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß schwarze oder farbige Kontrastmittel für die Magnet-Resonanz-Tomographie oder Röntgendiagnostik, sowie Gas-/Farbstoff- oder Gas-enthaltende Mikropartikel, wie sie für die Ultra-

schall-Diagnostik geeignet sind, die genannten Anforderungen überraschend gut erfüllen und daher hervorragend zur visuellen Markierung von Körpergewebe zum Zwecke der späteren Auffindung derartiger Gewebe geeignet sind.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von farbigen NMR- oder Röntgenkontrastmitteln oder von gegebenenfalls Farbstoff-haltigen Ultraschallkontrastmitteln zur Herstellung eines diagnostischen Mittels zur visuellen Markierung von Körpergewebe.

Beispiele für derartige Mittel seien nachfolgend genannt.

Geeignet sind z. B. Suspensionen von Magnetiten, d. h. kolloidale Lösungen oder Mischungen von FeO und Fe₂O₃, welche stabilisiert sind durch eine mehr oder weniger hydrophile Beschichtung mit in der Regel organischen Molekülen. Diese zeigen wegen ihres starken Einflusses auf die Relaxation von Protonen bzw. wegen ihrer Röntgenstrahl-absorbierenden Wirkung nicht nur einen bildgebenden Effekt in radiologischen Verfahren, sie sind darüberhinaus auf Grund ihrer dunkelbraunen bis schwarzen Farbe auch gut visuell erkennbar, so daß sie sich besonders gut zur Markierung von hellen Geweben (z. B. Fett, Drüsengewebe, Muskel, Bindegewebe) eignen. Obwohl Magnetite meist Partikeldurchmesser von weit unter 1 µm aufweisen und in Wasser gut suspendierbar und damit transportfähig sind, bleiben sie nach Injektion in das Gewebe für überraschend lange Zeit (Tage bis Monate) weitgehend unverdünnt am Injektionsort liegen und sind dort mit dem Auge gut zu erkennen. Magnetite sind lokal gut verträglich. Langfristig werden die Eisenoxide aufgelöst und das Eisen in den natürlichen Eisenstoffwechsel überführt.

Die Markierung mit Magnetiten eröffnet zusätzlich die Möglichkeit in histologischen Schnitten das in den Magnetiten enthaltene Eisen mit Kaliumrhodanid als "Berliner Blau" anzufärben.

Für die medizinische Anwendung geeignete Magnetite und Verfahren zu deren Herstellung sind z. B. in US 4,731,239, US 4,770,183, US 4,827,945, US 4,767,611, EP 0 186 616, SE 83 070 60, SE 84 054 99, GB 84-08127, DE 35 79 899, WO 91/05807 beschrieben.

Neben den Magnetiten sind für den angegebenen Zweck ebenfalls Metallporphyrine geeignet. Diese können je nach enthaltenem Metall entweder röntgenographisch oder falls es sich bei den komplexierten Metallen um paramagnetische Metallionen, wie z. B. Fe³⁺, Mangan³⁺, Gadolinium³⁺ etc. handelt, mittels der Magnet-Resonanz-Tomographie leicht nachgewiesen werden. Porphyrine absorbieren darüberhinaus Licht im sichtbaren Frequenzbereich, so daß sie auch visuell gut erkennbar sind. Besonders geeignet sind intensiv gefärbte Komplexe, wie sie z. B. in der EP 0 336 879 oder der EP 0 355 041 beschrieben sind.

Weiterhin geeignet sind Ultraschall-Kontrastmittel, die neben dem verkapselten echogebenden Gas auch einen Farbstoff enthalten. Derartige Kontrastmittel werden in der DE 43 30 958 beschrieben. Als Farbstoff eignen sich prinzipiell alle physiologisch verträglichen Farbstoffe, wie z. B. Hämoglobin, Chlorophyll usw. Geeignet sind aber auch solche Farbstoffe, die in unverkapselter Form schnell diffundieren würden (wie z. B. Methylenblau). Durch die Verkapselung wird die Diffusion vermieden, d. h. der Farbstoff bleibt am Injektionsort und kann dort erst unmittelbar vor der Operation, wie in der DE 43 30 958 beschrieben, durch Einstrahlen von Ultraschall geeigneter Frequenz und Wellenlänge freigesetzt werden.

Da Ultraschallgeräte in jedem Operationssaal verfügbar sind, kann die Farbstofffreisetzung von Chirurgen im Operationssaal selbst vorgenommen werden. Eine weitläufige Verteilung des Farbstoffs wird wegen der Kürze des Zeitraums zwischen der Freisetzung des Farbstoffs und der visuellen Wiederauffindung der markierten Stelle auch im Falle schnell diffundierender waserlöslicher Farbstoffe, weitgehend vermieden.

Zur Markierung geeignet sind aber auch andere mittels Ultraschall detektierbare Partikel, wie sie z. B. in der US 4,276,885, EP 0 327 490, EP 0 458 079 und EP 0 535 387 beschrieben werden.

Geeignet sind weiterhin verschiedene, wenig toxische Farbstoffe, die im Körper mittels üblicher bildgebender Verfahren nachgewiesen werden können, wie z. B. Melanin oder verschiedene stabile Radikale, die die Relaxationszeiten von Gewebe beeinflussen und daher zu einem bildgebenden Effekt in der Kernspintomographie führen. Als Beispiele für derartige Radikale seien genannt [G. Sosnovsky, A critical evaluation of the present status of toxicity of aminoxyl radicals, J. Pharmaceut. Sci. 81 (1992) 496-499].

Die zuvor genannten Mittel eignen sich hervorragend zur Markierung von Gewebe, insbesondere in Körperregionen, die der direkten visuellen Inspektion nicht zugänglich sind. Sie sind überraschenderweise auch über einen längeren Zeitraum ortsfest, d. h. sie diffundieren in dem Zeitintervall zwischen Markierung und Operation nicht oder vernachlässigbar langsam. Die genannten Mittel sind gut verträglich und überraschenderweise bereits in solch geringer Konzentration visuell erkennbar, wie sie auch in bildgebenden radiologischen Verfahren eingesetzt werden können. Dadurch ist es möglich mit der in einer Injektion verabreichten Dosis sowohl ein Kontrollbild mit einem bildgebenden Verfahren [wie z. B. Röntgentechnik einschließlich konventioneller Röntgenaufnahmen, wie z. B. Mammographie oder Computertomographie, die Magnetresonanztomographie (MRT) sowie Ultraschall-Methoden] anzufertigen, als auch eine für den Chirurgen leicht erkennbare Markierung herbeizuführen.

Die genannten Mittel sind damit von besonderem Wert bei der Markierung von kleinen Gewebearealen, die einen oder mehrere Zentimeter unter der Körperoberfläche liegen, insbesondere dann, wenn diese — bedingt durch ihre Lage in Weichteilgewebe — bei Bewegung leicht verschiebbar sind (z. B. Brustgewebe, Hodengewebe).

Sie eignen sich insbesondere auch, um die Stelle der vor dem operativen Eingriff (unter Kontrolle der erwähnten bildgebenden Verfahren) mittels Biopsienadel entnommenen Gewebeprobe zu markieren. Ohne eine solche Markierung wäre diese Stelle bei einem eventuell erforderlichen späteren chirurgischen Eingriff nach Zurückziehen der Nadel nicht wieder auffindbar.

Außerdem besteht, insbesondere bei kleinen Läsionen, häufig die Schwierigkeit die Biopsienadel exakt zu platzieren, so daß nicht — wie vermeintlich angenommen — verdächtiges Gewebe, sondern umliegendes gesundes Gewebe entnommen wird, was zwangsläufig zu einem falschen pathologischen Befund führt. Injiziert man hingegen unmittelbar nach der Probeentnahme die genannten Mittel durch dieselbe Kanüle, so kann in den entsprechenden bildgebenden Verfahren leicht erkannt werden, ob die Probe tatsächlich an der beabsichtigten Stelle entnommen wurde.

Erfindungsgemäß werden die genannten Mittel in der Regel über eine ausreichend lange Kanüle als Lösung,

Suspension oder Emulsion, unter Sichtkontrolle der genannten bildgebenden Verfahren in den entsprechenden Gewebebezirk eingebracht. Sofern es sich bei dem verwendeten bildgebenden Verfahren um die Kernspintomographie handelt, sind wegen der starken Magnetfelder selbstverständlich Kanülen aus unmagnetischem Material zu verwenden. Aufgrund der bildgebenden Eigenschaften des applizierten Mittels kann unmittelbar nach der Applikation ein Kontrollbild angefertigt werden, dem entnommen werden kann, ob die Markierung tatsächlich an der gewünschten Stelle plaziert wurde. Auch für den Fall, daß die Läsion verfehlt wurde, kann der operierende Chirurg den Tumorbezirk anhand der Farbmarkierung leicht wiederfinden, da die relative Lage des Tumorbezirks zur Farbmarkierung aus dem Kontrollbild leicht entnommen werden kann.

Wie bereits erwähnt sind die genannten Mittel im allgemeinen mit dem bloßen Auge leicht zu erkennen. Im Falle von Ultraschall-Kontrastmitteln auf der Basis von gashaltigen Mikropartikeln empfiehlt es sich jedoch (wegen der durch die Partikel hervorgerufenen nur undeutlichen Markierung), anstelle der visuellen Inspektion die Wiederauffindung der Partikel mit einem Ultraschall-Scanner vorzunehmen. Derartige Geräte sind (im Gegensatz zu einem Kernspintomographen oder einem Röntgengerät) in jedem Operationssaal verfügbar.

Bei einigen Markierungsmitteln, wie z. B. Porphyrinen empfiehlt es sich, den farbgebenden Effekt durch Anregung mit Infrarot- bzw. Ultraviolett-Licht zu verstärken. Auch die hierfür benötigten Hilfsmittel sind in jedem Operationssaal leicht zugänglich.

Alle für die Injektion in Gewebe vorgesehenen Zubereitungen müssen unbedingt steril sein. Sie können gewünschtenfalls die üblichen pharmazeutischen Hilfsstoffe zur Isotonisierung (z. B. Glucose, NaCl), Pufferung oder Stabilisierung der Lösung oder Emulsion oder Suspension enthalten.

Die applizierte Dosis richtet sich vor allem nach der Größe des zu markierenden Gewebebereiches. Sie kann mit 50 µl sehr gering sein. Bevorzugt werden Injektionsvolumina von 0,1 bis 2 ml. Bei größeren oder multifokalen Prozessen kann es notwendig sein, bis zu 5 oder mehr Milliliter des Markierungsmittels zu injizieren. Bei niedrigen Volumina werden höhere Konzentrationen der einzelnen Komponenten bevorzugt, bei höheren Volumina wird man eher mit geringeren Konzentrationen auskommen, auch um Artefakte in der bildgebenden Diagnostik zu vermeiden.

Die Konzentrationen der applizierten Mittel variieren in Abhängigkeit von dem jeweils gewählten bildgebenden Verfahren.

So werden kontrastgebende Substanzen für die Magnet-Resonanz-Tomographie in Konzentrationen von 0,1–100 µmol/ml, bevorzugt 1–20 µmol/ml eingesetzt, röntgenkontrastgebende Mittel im Bereich von 3–100 mg kontrastgebendes Element (z. B. Jod, Eisen etc.)/ml und ultraschallkontrastgebende Präparate im Bereich von 0,01 bis 50 µl Gas/ml, bevorzugt 0,1 bis 5 µl Gas/ml eingesetzt.

Magnetite werden als wäßrige Lösungen mit ca. 0,1 µmol Eisen/ml bis 500 µmol Eisen/ml eingesetzt. Bevorzugt sind stark gefärbte Lösungen mit ca. 20–500 µmol Eisen/ml.

Metalloporphyrine werden in dem gleichen Konzentrationsbereich eingesetzt (0,1 µmol/ml–500 µmol/ml), wobei der bevorzugte Bereich bei 20–200 µmol/ml liegt.

Andere paramagnetische oder Metallionen-haltige

oder Jod-haltige Farbstoffe wie z. B. Bengalrosa, Erythrosin, Tetrachlortetraiod-Fluorescein werden bevorzugt etwas höher konzentriert verwendet (50–500 µmol/ml).

Die angegebenen Konzentrationen sind als Richtwerte anzusehen, sie können im Einzelfall über- bzw. unterschritten werden. Sie sind ausreichend, um in dem jeweils gewählten radiologischen Verfahren einen deutlichen bildgebenden Effekt und gleichzeitig eine visuell erkennbare Markierung des Gewebes hervorzurufen.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

Beispiel 1

Markierung eines Biopsiebereichs mit Magnetiten

Ein verdächtiger Gewebebezirk wird im MRT identifiziert. Zur Untersuchung auf tumoröses Gewebe wird eine Biopsie mittels einer Nadel durchgeführt, bei der Zellen aus dem betreffenden Bereich gewonnen werden. Zur Kontrolle der exakten Lage der Nadel sowie zur Erleichterung der Wiederfindung des betreffenden Gewebebezirks im Falle einer späteren Operation werden 0,5 ml einer 50 mmolaren Dextran-Magnetitlösung (SH U 555, Schering AG, Berlin) injiziert. Nach Injektion der Lösung stellt sich der betreffende Bereich im MRT signalarm dar. Bei der intraoperativen Freilegung ist der Biopsiebereich an der bräunlichen Verfärbung zu erkennen. Auf gleiche Weise kann sich der Pathologe in dem Operationsmaterial orientieren und die notwendigen Schnitte in der richtigen Ebene anlegen.

Beispiel 2

Markierung eines Biopsiebereichs mit Porphyrinen

Es wird wie in Beispiel 1 beschrieben vorgegangen. Als Markierungslösung werden jedoch 2 µmol Mangan (als Mangan(III) {Tetrakis-[3-(carboxylatomethoxy)-phenyl]-porphyrin}-acetat-Komplex) in einem Milliliter physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Bei der intraoperativen Freilegung ist der Biopsiebereich an der gelbgrünlichen Verfärbung zu erkennen. Durch kurzfristiges Anregen mit UV-Licht kann der Farbefekt zusätzlich verstärkt werden.

Beispiel 3

Markierung eines Mammacarcinoms mit Magnetiten

Bei der Mammographie werden Mikroverkalkungen in einem Volumen von weniger als 0,5 cm³ gefunden. Die Region wird stereotaktisch biopsiert. Gleichzeitig werden 0,2 ml 500 mmolarer Magnetitlösung injiziert. Aufgrund der Biopsie erfolgt der Nachweis eines Mammacarcinoms. Die intraoperative Identifizierung der Läsion ist durch die deutlich schwarzbraune Verfärbung erleichtert.

Beispiel 4

Markierung von Muskelgewebe mit Magnetiten

Die Dextran-Magnetitlösung (SH U 555, Schering AG), wird in einer Konzentration von A) 500 mmol Fe/Liter, B) 250 mmol Fe/Liter, C) 125 mmol Fe/Liter und

einer Dosis von 1 ml in Muskelgewebe injiziert und mittels der Computertomographie untersucht. Das Magnetit-Depot ist in allen Fällen deutlich erkennbar und in der Form scharf begrenzt. Nach Offenlegen des betreffenden Gewebebezirkes ist das Magnetit durch die bräunliche Verfärbung optisch leicht erkennbar.

Beispiel 5

Methylenblau-haltige Mikropartikel aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure) werden in vitro in einer Gewebeprobe mit Ultraschall (Schalldruck > 50dB, Frequenz 2,5 MHz) bestrahlt und setzen dabei im Gewebe Methylenblau frei.

Die Methylenblau-haltigen Partikel sind herstellbar wie in der DE 43 30 958 (Beispiel 8) offenbart, indem 4 g Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50 : 50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) gelöst in 50 ml CH₂Cl₂, mit 20 mg Methylenblau, gelöst in 4 ml wäßriger 4%iger Gelatinelösung, unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk emulgiert werden. Anschließend werden weitere 200 ml einer 4%igen autoklavierten Gelatinelösung zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4%iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei -78 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die so erhaltenen Partikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen und können direkt zur Markierung von Körpergewebe eingesetzt werden.

Beispiel 6

Einem Hund werden 0,05 ml einer Suspension gasgefüllter Hohlkörper mit einer Hülle aus bioabbaubarem Poly-2-Cyanacrylsäurebutylester (WO93/25242; Beispiel 1) und einer mittleren Partikelgröße von ca. 2 µm in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. 3,5 Stunden später wird bei der Ultraschalluntersuchung mittels eines 3,5 MHz Schallkopfes ein scharf begrenztes Depot des Kontrastmittels gefunden, das in allen Ebenen gut lokalisierbar ist.

Patentansprüche

1. Verwendung von farbigen NMR- oder Röntgenkontrastmitteln oder von farbstoffhaltigen Ultraschallkontrastmitteln zur Herstellung eines diagnostischen Mittels zur visuellen Markierung von Körpergewebe.
2. Verwendung von Ultraschallkontrastmitteln zur Herstellung eines diagnostischen Mittels zur Markierung von Körpergewebe.
3. Verwendung eines Mittels nach Anspruch 1, enthaltend als farbiges NMR-Kontrastmittel mindestens ein Metallporphyrin, magnetische Eisenoxid Partikel, Nitroxid oder Melanin.
4. Verwendung eines Mittels nach Anspruch 1, enthaltend als farbiges Röntgen-Kontrastmittel Bengalrosa, Erythrosin oder Tetrachlortetraiod-Fluorescein.
5. Verwendung eines Mittels nach Anspruch 1, enthaltend als farbstoffhaltiges Ultraschall-Kontrastmittel Mikropartikel bestehend aus einer Hülle aus einem biologisch abbaubaren Polymeren und ei-

nem Gas- und Farbstoff-haltigen Kern.

6. Verwendung eines Mittels nach Anspruch 2, enthaltend als Ultraschall-Kontrastmittel Mikropartikel bestehend aus einer Polylactid-glycolid- oder Polycyanacrylat-Hülle und einem Gas-haltigen Kern.

7. Mittel zur Markierung von Körpergewebe, enthaltend mindestens eine farbige, radiologisch nachweisbare Substanz.

8. Mittel zur Markierung von Körpergewebe gemäß Anspruch 7, enthaltend als farbige, radiologisch nachweisbare Substanz Magnetite.

9. Mittel zur Markierung von Körpergewebe gemäß Anspruch 7, enthaltend als farbige, radiologisch nachweisbare Substanz Metall-Komplexe von Porphyrinen.

10. Mittel zur Markierung von Körpergewebe gemäß Anspruch 7, enthaltend als farbige, radiologisch nachweisbare Substanz Gas-enthaltende Mikropartikel, die gegebenenfalls zusätzlich einen Farbstoff enthalten.

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)